

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Irena Janković

**IZOLACIJA, PROČIŠĆAVANJE I DJELOMIČNA KARAKTERIZACIJA
POLIFENOL OKSIDAZE IZ JABUKA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, prosinac, 2014.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primjenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za biokemiju i toksikologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Biokemija
Tema rada je prihvaćena na VII. sjednici Odbora za završne i diplomske ispite Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 09. 07. 2012.
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivica Strelec
Pomoć pri izradi: -

IZOLACIJA, PROČIŠĆAVANJE I DJELOMIČNA KARAKTERIZACIJA POLIFENOL OKSIDAZE IZ JABUKA

Irena Janković, 1434/96

Sažetak:

Polifenol oksidaza je izolirana iz jabuka sorte Idared uz stupanj pročišćenja od 9,7 i iskorištenje 61,61%. Postupak pročišćavanja uključivao je taloženje amonijevim sulfatom, taloženje acetonom i sušenje acetonskog taloga u struji dušika pri 24°C. Enzim je pokazivao pH optimum pri pH 7, i optimalnu temperaturu djelovanja pri 24 °C uz L-3,4-dihidroksifenilalanin kao supstrat. Od ispitanih supstrata, polifenol oksidaza je pokazala najveću aktivnost uz katehin, a potom uz epikatehin, 4-metilkatehol, klorogensku kiselinu, L-3,4-dihidroksifenilalanin, kafeinsku kiselinu te epigallocatehingalat. Najboljim inhibitorima polifenol oksidaze pokazali su se glutation, askorbinska kiselina i cistein.

Ključne riječi: *izolacija, karakterizacija, polifenol oksidaza, pročišćavanje*

Rad sadrži: 42 stranica
12 slika
9 tablica
0 priloga
74 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|---|---------------|
| 1. doc. dr. sc. <i>Dajana Gašo-Sokač</i> | predsjednik |
| 2. izv. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i> | član-mentor |
| 3. doc. dr. sc. <i>Marina Tišma</i> | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 19. prosinca 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u
Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Biochemistry and Toxicology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Biochemistry
Thesis subject was approved by the Board for Graduate and Exams of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. VII. held on July 9, 2012.
Mentor: *Ivica Strelec*, PhD, associate prof.
Technical assistance: -

ISOLATION, PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF APPLE POLYPHENOL OXIDASE

Irena Janković, 1434/96

Summary:

Polyphenol oxidase was purified from the apple variety Idared with 9.7-fold purification and 61.61% recovery by ammonium sulphate precipitation, acetone precipitation and drying of acetone precipitate under gentle stream of nitrogen at 25°C. Optimum polyphenol oxidase activity was at pH 7.0, and optimum temperature for activity was at 24°C, both determined with L-3,4-dihydroxyphenylalanine as substrate. Of the substrates tested, activity was greatest with catechin followed by 4-methylcatechol, chlorogenic acid, L-3,4-dihydroxyphenylalanine, caffeic acid and epigallocatechin gallate. The most effective inhibitors tested were glutathione, ascorbic acid and cysteine.

Key words: *isolation, characterization, polyphenol oxidase, purification*

Thesis contains: 42 pages
12 figures
9 tables
0 supplements
74 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Dajana Gašo-Sokač</i> , PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. <i>Marina Tišma</i> , PhD, assistant prof. | member |
| 4. <i>Lidija Jakobek</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: December 19, 2014.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in
Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Ivi Strelcu, na pomoći, savjetima i strpljenju tijekom odrade i pisanja diplomskog rada, kao i gospođi Dragici Roknić na nesebičnoj pomoći u laboratoriju.

Zahvaljujem svim prijateljima i jednoj posebnoj prijateljici na potpori i podršci.

Zahvaljujem i svom dečku na strpljenju i ljubavi.

Posebno zahvaljujem i ujedno posvećujem diplomski rad svojoj majci koja mi je omogućila školovanje, te bila i ostala najveći oslonac i podrška sve ove godine.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. POLIFENOL OKSIDAZA	4
2.2. KARAKTERISTIKE POLIFENOL OKSIDAZA	7
2.2.1. Supstratna specifičnost polifenol oksidaza	7
2.2.2. Molekulska masa	8
2.2.3. pH optimum	10
2.2.4. Optimalna temperatura za aktivnost polifenol oksidaza	11
2.2.5. Inhibitori polifenol oksidaza	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. ZADATAK	15
3.2. MATERIJAL I METODE	15
3.2.1. Uzorci i kemikalije	15
3.2.2. Ekstrakcija polifenol oksidaze	15
3.2.3. Taloženje amonijevim sulfatom	16
3.2.4. Taloženje acetonom	17
3.2.5. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze	17
3.2.6. Određivanje koncentracije proteina	18
3.2.7. Određivanje pH optimuma	18
3.2.8. Određivanje optimalne temperature	18
3.2.9. Inhibicija polifenol oksidaze	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. OPTIMALNI RASPON KONCENTRACIJA AMONIJEVA SULFATA ZA TALOŽENJE POLIFENOL OKSIDAZE	21
4.2. UTJECAJ TALOŽENJA ACETONOM I SLIJEDNOG PROSUŠIVANJA ACETONSKOG TALOGA NA AKTIVNOST POLIFENOL OKSIDAZE	24
4.3. OPTIMIZIRANI POSTUPAK IZOLACIJE I DJELOMIČNOG PROČIŠĆAVANJA POLIFENOL OKSIDAZE	26
4.4. KARAKTERIZACIJA POLIFENOL OKSIDAZE	27
4.4.1. Supstratna specifičnost	27
4.4.2. pH optimum	29
4.4.3. Optimalna temperatura	30
4.4.4. Inhibitori polifenol oksidaze	31
5. ZAKLJUČCI	34
6. LITERATURA	36

1. UVOD

Polifenol oksidaze su skupina enzima koja je široko rasprostranjena u prirodi, a također je poznata pod nazivima tirozinaza, polifenolaza, fenolaza, katehol oksidaza, krezolaza ili kateholaza (Whitaker, 1994.). Ovaj se enzim u biljnoj stanici nalazi u plastidima, a njegovi prirodni supstrati, fenolni spojevi uglavnom u vakuolama. Oštećenje biljnog tkiva tijekom branja ili tehnološke obrade može dovesti do pucanja staničnih organela, i na takav način osigurati da polifenol oksidaza dolazi u kontakt sa svojim supstratom (polifenoli), što dovodi do reakcija enzimskog i slijedno neenzimskog posmeđivanja (Kim i sur., 2001.). Oksidacijom i slijednim umrežavanjem polifenola gube se pozitivna svojstva polifenola na ljudsko zdravlje (Pichler, 2001).

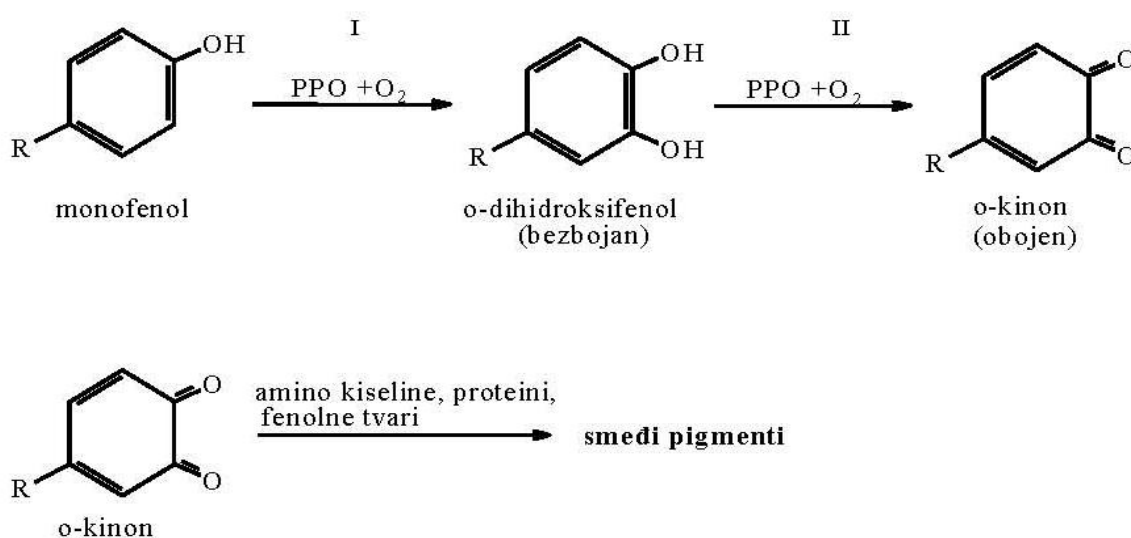
Kako bi se reakcije enzimskog posmeđivanja u voću i povrću spriječile ili barem svele na minimum, provode se brojna ispitivanja inhibicije polifenol oksidaze, bilo u pripremljenim ekstraktima, bilo na pročišćenim enzimima.

Upravo je cilj ovog istraživanja ispitati utjecaj najčešće korištenih inhibitora polifenol oksidaze, na aktivnost djelomično pročišćene polifenol oksidaze iz sorte jabuka Idared.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIFENOL OKSIDAZA

Polifenol oksidaze spadaju u skupinu metaloenzima koji sadrže ione bakra kao prostetsku skupinu, te kataliziraju hidroksilaciju monofenola do *o* - difenola, te oksidaciju *o* - difenola u *o* - kinone, koji zatim mogu reagirati međusobno ili s aminima, tiolima ili fenolima, pri čemu nastaju obojeni spojevi melanini nizom reakcija enzimskog posmeđivanja ili melaninizacije (**Slika 1**) (Kruger i sur., 1987.).



Slika 1 Reakcija enzimskog posmeđivanja (Midhat, 2013.)

Naime, do reakcija enzimskog posmeđivanja dolazi kada se mehanički ošteti biljna stanica (**Slika 2**), a to je najčešće kod minimalnog procesiranja voća (rezanje, guljenje, mljevenje, usitnjavanje i sl.). Na intenzitet ovih reakcija utječe stupanj aktivnosti enzima, količina supstrata, količina kisika, temperatura, pH i vrijeme trajanja reakcije. Enzimsko posmeđivanje, nakon početnog stupnja u kojem sudjeluju enzimi, prelazi u neenzimsko pri čemu se javljaju sekundarne reakcije, što se odražava u promjeni boje prehrambenih proizvoda. Ove reakcije su vrlo kompleksne i mogu uzrokovati promjene mirisa, okusa, boje, teksture i arome u različitim vrstama prehrambenih proizvoda (Lovas, 1997.).



Slika 2 Prikaz enzimskog posmeđivanja jabuke

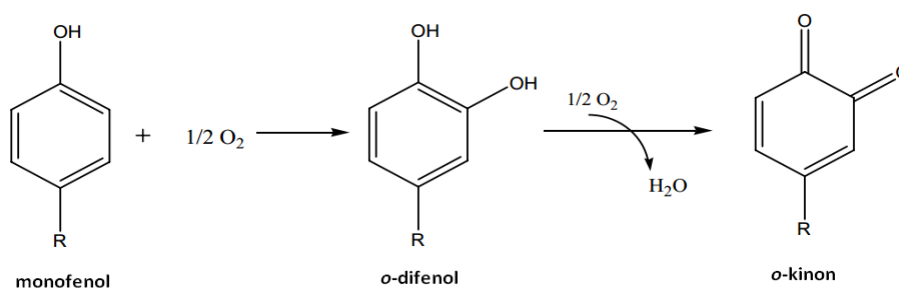
(<http://suite101.com/article/enzymes-simple-classroom-science-experiment-a188575>)

[13.2.13.]

Trivijalna imena skupine enzima koja katalizira hidroksilaciju monofenola do *o*-difenola, te oksidaciju *o*-difenola u *o*-kinone su: katehol oksidaze, kateholaze, difenoloksidaze, *o*-difenolaze i tirozinaze (Lovas, 1997.).

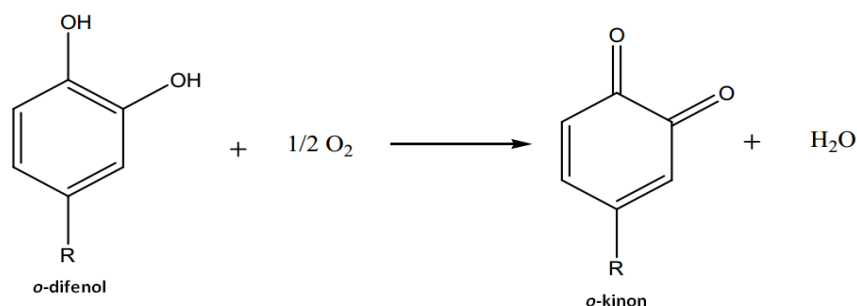
Postoje tri tipa reakcija koja opisuju enzimsku aktivnost ove skupine enzima (Kruger i sur., 1987.):

1. Tirozinazna aktivnost (enzimi su tirozinaza, kateholaza i fenolaza) predstavlja hidroksilaciju i oksidaciju fenolnih supstrata (**Slika 3**).



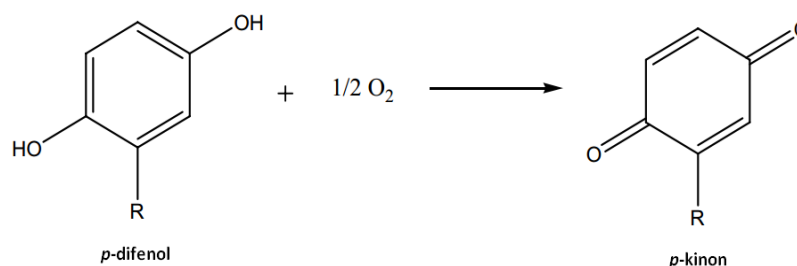
Slika 3 Tirozinazna enzimaska aktivnost (Güray, 2009.)

2. Polifenol oksidazna aktivnost (enzimi su polifenol oksidaza, kateholaza, kateholoksidaza, *o*-difenolaza) predstavlja oksidaciju *o*-difenola u *o*-kinone (**Slika 4**).



Slika 4 Polifenol oksidazna enzimsko aktivnost (Güroy, 2009.)

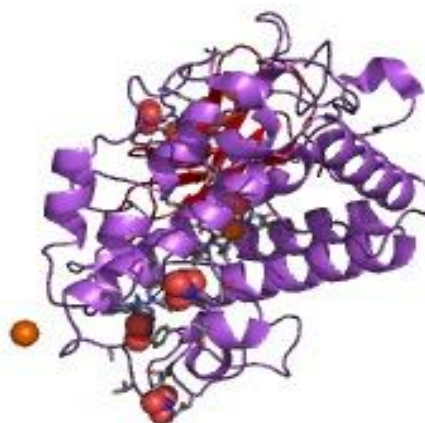
3. Lakazna aktivnost predstavlja oksidaciju *p*-difenola u *p*-kinone (**Slika 5**).



Slika 5 Lakazna enzimsko aktivnost (Güroy, 2009.)

Katalitički dio molekule polifenol oksidaze sadrži 2 mjesta vezanja bakra u kojima je bakar vezan pomoću tri ostatka histidina. Ta mjesta u molekuli su mjesta interakcije enzima sa molekularnim kisikom iz zraka i sa fenolnim supstratom (**Slika 6**).

Pronađeno je da u gljivama ovi enzimi sadrže 4 atoma bakra. Ako se bakar djelomično ili potpuno ukloni iz proteinske molekule, dolazi do inaktivacije ili pada enzimsko aktivnosti, a njegovim ponovnim uvođenjem enzim se ponovno aktivira (Brooks i sur., 1966.; Mathew i sur., 1971.).



Slika 6 Tirozinaza sa Cu kao prostetskom skupinom (Matoba i sur., 2006.)

2.2. KARAKTERISTIKE POLIFENOL OKSIDAZA

2.2.1. Supstratna specifičnost polifenol oksidaza

Polifenol oksidaza je enzim široke supstratne specifičnosti koji provodi oksidaciju *o*-difenola u *o*-kinone (Anderson i sur., 2006.; Güray, 2009.; Pichler, 2001.).

Prema literaturnim izvorima, kao prirodni supstrati ovih enzima u jabukama navode se prije svega katehin, epikatehin i klorogenska kiselina (Rocha i Morais, 2001.), dok se supstratna specifičnost ove skupine enzima u voću i povrću prema nekim literaturnim izvorima može proširiti i na 3,4-dihidroksifenilalanin, estere cimetne kiseline, te derivate kafeinske kiseline (Kolodziejczyk i sur., 2010.; Macheix i sur., 1990.).

Štoviše istraživanja na pročišćenim ili djelomično pročišćenim enzimima iz različitih sorti jabuka (**Tablica 1**) pokazuju da polifenol oksidaze iz jabuka razgrađuju različite polifenolne spojeve, i to različitim afinitetom. Pri tome se kao najbolji supstrati polifenol oksidaze iz jabuka u većini slučajeva ističu 4-metilkatehol, katehol ili klorogenska kiselina, dok se L-3,4-dihidroksifenilalanin koji se najčešće koristi kao supstrat za ispitivanje aktivnosti ovoga enzima svrstava tek na četvrto ili čak niže mjesto po afinitetu (Jang i Moon, 2011.; Ni Eidhin i sur., 2006.; Oktay i sur., 1995.; Rocha i Morais, 2001.; Rocha i sur., 1998.; Zhou i sur., 1993.).

Tablica 1 Supstratna specifičnost polifenol oksidaza iz jabuka

Izvor polifenol oksidaze	Supstratna specifičnost		Reference
	Pokazuje supstratnu specifičnost	Ne pokazuje supstratnu specifičnost	
Jabuka sorte Bramley	4-metilkatehol > katehol > pirogalol > epikatehin > kafeinska kiselina > DL-3,4-dihidroksifenilalanin	tirozin i <i>p</i> -kumarična kiselina	Ni Eidhin i sur., 2006.
Jabuka sorte Fuji	4-metilkatehol > klorogenska kiselina > katehol > L-3,4-dihidroksifenilalanin > L-tirozin	-	Jang i Moon, 2011.
Jabuka sorte Jonagored	L-3,4-dihidroksifenilalanin > 4-metilkatehol > katehin > <i>p</i> -krezol > dopamin > katehol > L-tirozin	-	Rocha i Morais, 2001.
Jabuka sorte Amasya	katehol > 4-metilkatehol > pirogalol > L-3,4-dihidroksifenilalanin	-	Oktay i sur., 1995.
Jabuka sorte Starking	klorogenska kiselina > 4-metilkatehol > dopamin > <i>p</i> -krezol	tirozin	Rocha i sur., 1998.
Kora jabuke sorte Monroe	4-metilkatehol > klorogenska kiselina > katehol > D-katehin > pirogalol > dopamin > DL-3,4-dihidroksifenilalanin > tirozin	-	Zhou i sur., 1993.

2.2.2. Molekulska masa

Molekulska masa polifenol oksidaza izoliranih iz različitih biljnih vrsti (**Tablica 2**) kreće se u rasponu od 39 do 237 kDa. U slučaju polifenol oksidaza izoliranih iz različitih sorti jabuka, raspon molekulskih masa kreće se od 45 kDa (Ni Eidhin i sur., 2006.) do 65 kDa (Murata i sur., 1992.). Pri tome je ključno navesti da uočene razlike u molekulskim masama polifenol oksidaza izoliranih iz različitih sorti jabuka, mogu biti rezultat primjene različitih tehnika određivanja molekulske mase, ili odraz eventualne djelomične proteolize tijekom izolacije enzima. U prilog tomu govori i istraživanje Marquesa i sur. (1995.) koji su pokazali da postoje razlike u molekulskoj masi nativnih i djelomično proteoliziranih oblika polifenol oksidaza izoliranih iz jabuka, pri čemu je za nativni oblik izmjerena molekulska masa od 63 kDa, dok je za proteolizirani oblik ona iznosila svega 42 kDa.

Tablica 2 Molekulske mase polifenol oksidaza izoliranih iz različitih biljnih vrsti

Izvor polifenol oksidaze	Molekularna masa (kDa)	Tip određivanja molekularne mase	Referenca
Jabuka sorte Bramley	45	Elektroforeza	Ni Eidhin i sur., 2006.
Kora jabuke sorte Red Delicious	46	Gel filtracija	Janovitz-Klapp i sur., 1989.
Jabuka sorte Fuji	63	Elektroforeza	Jang i Moon, 2011.
Jabuka sorte Fuji	65	Gel filtracija	Murata i sur., 1992.
Jabuka sorte Fuji	65	Elektroforeza	Tsurutani i sur., 2002.
Breskva	60	Elektroforeza	Cabanes i sur., 2007.
Pšenica	35 40	Gel filtracija Elektroforeza	Kihara i sur., 2005.
Grožđe	60	Elektroforeza	Rathjen i Robinson, 1992.
Gljive	70	Elektroforeza	Fan i Flurkey, 2004.
Banana	58,2	Elektroforeza	Nematpour i sur., 2008.
Špinat	42,5	Elektroforeza	Golbeck i Cammarata, 1981.
Krumpir	43	Gel filtracija	Yong i Hye, 1999.
Kupus	39 40	Gel filtracija Elektroforeza	Fujita i sur., 1995.
Peršin	237	Gel filtracija	Dogru i sur., 2013.

2.2.3. pH-optimum

Optimalni pH za aktivnost polifenol oksidaza različitih biljnih vrsta varira u rasponu od pH 4,5 od 8 (**Tablica 3**). Pri tome je ključno naglasiti da je optimalni pH ovisan o primijenjenom supstratu, puferu za ispitivanje aktivnosti enzima, kao i postojanju izoenzima (Alyward i Haisman, 1969.; Mayer i Harel, 1981.; Whitaker, 1994.). U slučaju polifenol oksidaza iz jabuka, zabilježeno je da se optimalni pH kreće u rasponu od 5,0 do 7,5 (Mihalyi i sur., 1978.; Ni Eidhin i sur., 2006.; Oktay i sur., 1995.; Rocha i Morais, 2001.; Rocha i sur., 1998.).

Tablica 3 pH optimum za aktivnost polifenol oksidaza iz različitih biljnih izvora

Izvor polifenol oksidaze	pH optimum	Supstrat	Referenca
Jabuka sorte Bramley	6,5	katehol	Ni Eidhin i sur., 2006.
Jabuka sorte Jonagored	5,0 7,5	katehol	Rocha i Morais, 2001.
Jabuka sorte Amasya	7,0	katehol	Oktay i sur., 1995.
Jabuka sorte Jonathan	6,2	klorogenska kiselina	Mihalyi i sur., 1978.
Jabuka sorte Starking	6,1	klorogenska kiselina	Mihalyi i sur., 1978.
Jabuka sorte Starking	6,5	katehol	Rocha i sur., 1998.
Pšenične mekinje	5,5-6	L-3,4-dihidroksifenilalanin	Yamasaki i sur., 2008.
Menta	6,5 5 4,5	katehol 4-metilkatehol kafeinska kiselina	Neves i sur., 2009.
Krumpir	6,6	katehol	Yong i Hye, 1999.
Batat	7	katehol	Manohan i Wai, 2012.
Ananas	6-7	katehol	Das i sur., 1997.
Špinat	7-8	dopamin katehol klorogenska kiselina kafeinska kiselina pirogalol DL-3,4-dihidroksifenilalanin	Golbeck i Cammarata, 1981.
Dunja	8	katehol	Yağar i Sağiroğlu, 2002.

2.2.4. Optimalna temperatura za aktivnost polifenol oksidaza

Optimalna temperatura za djelovanje polifenol oksidaza iz različitih biljnih vrsta najčešće se kreće u rasponu od 20 do 30°C (**Tablica 4**). Pri tome je nužno reći da je u nekim slučajevima čak zabilježeno da optimalna temperatura djelovanja enzima ovisi i o upotrebljenom supstratu. Tako je za aktivnost polifenol oksidaze izolirane iz mente, uz katehol i klorogensku kiselinu kao supstrate zabilježena optimalna temperatura od 30°C, a uz 4-metilkatehol od 15°C (Neves i sur., 2009.). U slučaju optimalne temperature polifenol oksidaza jabuka zabilježen je raspon od 25 do 30°C (Ni Eidhin i sur., 2006.; Yong i Hye, 1999.; Zhou i sur., 1993.).

Tablica 4 Optimalna temperatura aktivnosti polifenol oksidaza iz raznih biljnih izvora

Izvor polifenol oksidaza	Optimalna temperatura [°C]	Supstrat	Referenca
Jabuka sorte Bramley	30	katehol	Ni Eidhin i sur., 2006.
Jabuka sorte Jonathan	30	klorogenska kiselina	Yong i Hye, 1999.
Jabuka sorte Starking	25	klorogenska kiselina	Yong i Hye, 1999.
Kora jabuke sorte Monroe	30	katehol	Zhou i sur., 1993.
Menta	30	katehol	Neves i sur., 2009.
	30	kafeinska kiselina	
	15	4-metilkatehol	
Dunja	40	katehol	Yağar i Sağiroğlu, 2002.
Pšenične mekinje	25-30	L-3,4-dihidroksifenilalanin	Yamasaki i sur., 2008.
Batat	30	katehol	Manohan i Wai, 2012.
Grožđe	25-45	4-metilkatehol	Valero i sur., 1988.

2.2.5. Inhibitori polifenol oksidaze

Inhibicija polifenol oksidaze ili poništenje njenog djelovanja može se postići na nekoliko načina: dodatkom tvari koje reduciraju obojene dopakinone, poput askorbinske kiseline, ili tvari koje reagiraju s kinonima i stvaraju nebojene spojeve, tvarima koje denaturiraju proteinsku strukturu polifenol oksidaze kao kiseline ili baze, te ireverzibilnim, kompeticijskim i nekompeticijskim inhibitorima (Chang, 2009.).

Kao inhibitori polifenol oksidaza izoliranih iz jabuka u literaturnim izvorima navode se natrijev metabisulfit, askorbinska kiselina, L-cistein, limunska kiselina, dinatrijeva sol etilendiaminotetraoctene kiseline te natrijev klorid (**Tablica 5**).

Tablica 5 Inhibitori polifenol oksidaze iz jabuka

Izvor polifenol oksidaze	Utjecaj inhibitora	Referenca
Jabuka sorte Bramley	natrijev metabisulfit > askorbinska kiselina > L-cistein > limunska kiselina > EDTA dinatrijeva sol > natrijev klorid	Ni Eidhin i sur., 2006.
Jabuka sorte Jonagored	natrijev metabisulfit > L-cistein > askorbinska kiselina	Rocha i Morais, 2001.
Jabuka sorte Amasya	L-cistein > di-natrijev dihidrogenfosfat > natrijev cijanid	Oktay i sur., 1995.
Kora jabuke sorte Monroe	L-cistein > askorbinska kiselina > natrijev cijanid	Zhou i sur., 1993.

Natrijev metabisulfit jedan je od jakih inhibitora polifenol oksidaze, a prema literaturnim izvorima spada u skupinu kompeticijskih inhibitora (Erat i sur., 2006.). Prema Tayloru i sur. (1986) natrijev metabisulfit je antioksidans i izbjeljivač, što upućuje da njegovo inhibitorno djelovanje uključuje redukciju obojenih dopakinona, i/ili reakciju sulfatne skupine s kinonima te nastajanje nebojenih spojeva. Iako je poznat kao jaki inhibitor enzimskog i neenzimskog posmeđivanja, njegova primjena u industriji je ograničena sanitarnim propisima zbog štetnog djelovanja na zdravlje ljudi (Taylor i sur., 1986.).

Askorbinska kiselina ili vitamin C u inhibiciji polifenol oksidaze može djelovati na više načina: kompeticijski, nekompeticijski i stvaranjem kelatnih kompleksa. Askorbinska kiselina reducira kinone koji su nastali oksidacijom polifenola natrag do fenolnih spojeva. Također može djelovati i direktno na enzim, tvoreći kelatne spojeve s njegovom prostetskom skupinom (Chang, 2009.; Pierpoint, 1966.).

Cistein djeluje nekompeticijski u inhibiciji polifenol oksidaze, a slično djelovanje pokazuje i glutation, te su se ovi inhibitori pokazali učinkoviti u prevenciji posmeđivanja (Gacche i sur., 2006.; Molnar-Perl i Friedman, 1990.a; 1990.b). Njihova velika učinkovitost rezultat je formiranja bezbojnih tiola koji konjugiraju sa *o*-kinonima (Crumière, 2000.; Negishi i Ozawa, 2000.). Ioannou i Ghoul (2013.) navode da je glutation vrlo važan inhibitor polifenol oksidaze zahvaljujući svojim antioksidativnim svojstvima.

Osim navedenih, nekompeticijski inhibitor polifenol oksidaze također je i natrijev klorid. Inhibicijski učinak natrijev klorid ima zahvaljujući kloridnom anionu (Janovitz-Klapp i sur., 1990.). De Poix i sur. (1980.) objasnili su sinergijsko djelovanje askorbinske kiseline i natrijeva klorida na način da askorbinska kiselina reducira nastale kinone i odgađa posmeđivanje, dok kloridni anion natrijeva klorida direktno inhibira enzim polifenol oksidazu.

Limunska kiselina djeluje kao ireverzibilni inhibitor polifenol oksidaze. Ponaša se kao kelatni agens, veže ione bakra iz aktivnog središta enzima i na taj način ga inhibira. Limunska kiselina se često koristi u kombinaciji sa drugim inhibitorima posmeđivanja, kao npr. sa askorbinskom kiselinom, a također je dokazana učinkovitost kombinacije askorbinske kiseline, eritorbične kiseline i limunske kiseline u sprečavanju posmeđivanja (Langdon, 1987.; Obradović, 2011.; Santerre i sur., 1988.).

Dinatrijeva sol etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA) u inhibiciji polifenol oksidaze ima isti mehanizam djelovanja kao limunska kiselina, kelatni je agens te reagira sa bakrom iz aktivnog mjesta polifenol oksidaze i na takav način inhibira enzimsku reakciju (McEvily i sur., 1992.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je izolirati polifenol oksidazu iz jabuke sorte Idared, djelomično je pročistiti i potom tako djelomično pročišćen enzim biokemijski okarakterizirati.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Uzorci i kemikalije

Enzim polifenol oksidaza izoliran je iz jabuka sorte Idared koje su kupljene u lokalnoj trgovini i čuvane do uporabe na temperaturi +4°C najviše tjedan dana.

Pri spektrofotometrijskom određivanju enzimske aktivnosti kao osnovni supstrat je korišten L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) proizvođača Sigma (Njemačka). Polifenol oksidaza i L-3,4-dihidroksifenilalanin bili su otopljeni u 100 mM fosfatnom puferu pH 6,8.

Natrijev dihidrogen-fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) proizvođača Alkaloid (Makedonija) i dinatrijev hidrogen-fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) proizvođača Kemika (Hrvatska) korišteni su u pripremi fosfatnog pufera. Pufer je sadržavao 0,1% Triton X-100 proizvođača Fluka (Njemačka), 0,1% polivinil-pirolidon (PVP) proizvođača Sigma (Njemačka) i 10 mM askorbinsku kiselinu proizvođača Kemika (Hrvatska). Za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordici, korišten je Bradford reagens, proizvođača Biorad (Njemačka). Za postupak taloženja korišten je amonijev sulfat (AmS) proizvođača Kemika (Hrvatska). Sve ostale kemikalije korištene u ovom radu bile su p.a. čistoće proizvođača Sigma (Njemačka), Merck (Njemačka) ili Kemika (Hrvatska).

3.2.2. Ekstrakcija polifenol oksidaze

Odvazi od 100 g jabuke koja je prethodno oguljena i izrezana na kockice, dodano je 100 mL 100 mM fosfatnog pufera pH 6,8 koji je sadržavao 0,1 % Triton X-100, 0,1 % PVP i 10 mM askorbinsku kiselinu te je smjesa homogenizirana u laboratorijskoj sjeckalici Waring blender (Waring Products, USA) tijekom tri minute uz brzinu okretaja noževa od 5000 obrtaja po minuti. Dobivena suspenzija je profiltrirana kroz sloj gaze, a filtrat je dodatno izbistren

centrifugiranjem pri 15000 g, tijekom 10 minuta pri +4°C. Tako dobiven bistri ekstrakt je korišten za daljnja ispitivanja.

3.2.3. Taloženje amonijevim sulfatom

Kako bi se ustanovio optimalni raspon koncentracija amonijeva sulfata (AmS) potrebitog za pročišćavanje polifenol oksidaze provedena je serija taloženja amonijevim sulfatom (20, 30, 80 i 90%). U alikvotne ekstrakte u epruvetama za centrifugiranje volumena 75 mL dodana je točno određena odvaga amonijeva sulfata potrebitog za postizanje željenog zasićenja amonijeva sulfata (20, 30, 80 ili 90%). Suspenzija je intenzivno promiješana na vortex miješalici i taloženje proteina je provođeno tijekom jednog sata pri +4°C uz miješanje 30 s na vortex miješalici svakih 10 minuta. Po isteku vremena, provedeno je centrifugiranje pri 15000 g tijekom 20 minuta pri +4°C. Supernatanti su odvojeni od taloga dekantiranjem, a talozi otopljeni u 100 mM fosfatnom puferu pH 6,8, te su obje frakcije korištene za određivanje aktivnosti polifenol oksidaze i koncentracije proteina.

Nakon utvrđivanja optimalnog raspona koncentracija amonijeva sulfata, ekstrakt je podvrgnut dvostupanjskom taloženju amonijevim sulfatom. U prvom koraku taloženja ekstraktu u epruveti za centrifugiranje volumena 75 mL dodana je proračunata količina amonijeva sulfata kako bi se postiglo 30% zasićenje, suspenzija je intenzivno promiješana na vortex miješalici te su proteini taloženi tijekom jednog sata pri +4°C uz miješanje 30 s na vortex miješalici svakih 10 minuta. Po isteku vremena, provedeno je centrifugiranje pri 15000 g tijekom 20 minuta pri +4°C. Supernatant koji je sadržavao polifenol oksidazu je odvojen od taloga dekantiranjem, a talog odbačen. U supernatant je potom dodana proračunata količina amonijeva sulfata potrebna da se postigne 80% zasićenje, te je postupak taloženja proteina proveden na gore opisani način. Nakon centrifugiranja pri 15000 g tijekom 20 minuta pri +4°C, supernatant je odvojen od taloga i odbačen. Talog koji je sadržavao polifenol oksidazu je otopljen u određenom volumenu 100 mM fosfatnog pufera pH 6,8, te korišten za određivanje aktivnosti polifenol oksidaze i koncentracije proteina, te daljnji postupak pročišćavanja.

3.2.4. Taloženje acetonom

U svrhu daljnjeg pročišćavanja polifenol oksidaze iz otopine pripremljene otapanjem taloga dobivenog nakon dvostupanjskog pročišćavanja amonijevim sulfatom (30-80%), provedeno je taloženje acetonom pri dva različita volumna omjera otopine enzima i acetona, 1:2 i 1:3.

U oba slučaja postupak taloženja se sastojao u sljedećem: na jedan volumni dio otopine enzima dodano je dva ili tri volumna udjela ledeno hladnog acetona (-20°C), suspenzija je promiješana miješanjem na vortex mješalici, i taloženje polifenol oksidaze provedeno tijekom 30 min pri -20°C . Po isteku vremena, provedeno je centrifugiranje pri 15000 *g* tijekom 20 minuta pri $+4^{\circ}\text{C}$. Supernatanti su odvojeni od taloga dekantiranjem, a talozi otopljeni u 100 mM fosfatnom puferu pH 6,8, i korišteni za određivanje aktivnosti polifenol oksidaze i koncentracije proteina. Nakon što je utvrđeno da volumni omjer otopine enzima i acetona, 1:3, daje bolje rezultate, ponovljeni postupci taloženja acetonom provedeni su na gore opisan način pri volumnom omjeru 1:3.

Acetonski talog pripremljen na gore opisan način dodatno je prosušen u struji dušika tijekom 2 sata pri sobnoj temperaturi.

Postupak sušenja acetonskog taloga osim u struji dušika, pokušao se provesti i direktnim sušenjem acetonskog taloga u sušioniku pri $+40^{\circ}\text{C}$ tijekom 12 sati, ali se ovaj način pokazao potpuno neadekvatnim budući je došlo do značajnog gubitka aktivnosti polifenol oksidaze.

3.2.5. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze

Aktivnost polifenol oksidaze je određivana uz supstrat L-3,4-dihidroksifenilalanin kontinuiranim spektrofotometrijskim testom pri 475 nm (Šimunić, 2011.).

Reakcijska smjesa za ispitivanje aktivnosti enzima se sastojala od 450 μL 100 mM fosfatnog pufera pH 6,8, 50 μL enzima i 500 μL 20 mM L-3,4-dihidroksifenilalanina u 100 mM fosfatnom puferu pH 6,8. Reakcija je započeta dodatkom L-3,4-dihidroksifenilalanina i nakon početne zadržke od 30 sekundi mjerena je promjena apsorbancije pri 475 nm svakih 10 sekundi tijekom 100 sekundi uz kontrolu raspada supstrata kao slijepu probu priređenu ispuštanjem enzima iz reakcijske smjese. Aktivnost polifenol oksidaze ($\Delta A_{475\text{nm}} \text{ min}^{-1}\text{mL}^{-1}$) određena je iz nagiba linearnog dijela krivulje, te izražena u enzimskim jedinicama (U). Jedna enzimska jedinica (U) definirana je kao promjena apsorbancije za 0,001 jedinicu u minuti.

U slučaju određivanja supstratne specifičnosti polifenol oksidaze osim L-3,4-dihidroksifenilalanina kao supstrati su ispitani epikatehin, epigalokatehingalat, katehin, kafeinska i klorogenska kiselina, 4-metilkatehol, tirozin i transferulinska kiselina i to pri tri različite koncentracije u reakcijskoj smjesi 10 mM, 2,5 mM i 0,1 mM. Pri tome je mjerenje aktivnosti provedeno kontinuiranim spektrofotometrijskim testom pri 475 nm uz kafeinsku kiselinu, 4-metilkatehol, tirozin i epikatehin kao supstrate, a pri 420 nm uz klorogensku i transferulinsku kiselinu, katehin i epigalokatehingalat.

3.2.6. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordici (1976.). Metoda se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G – 250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, uslijed čega dolazi do stvaranja kompleksa protein:boja, koji u kiselom mediju pokazuje apsorpcijski maksimum pri 595 nm.

Uzorku volumena 20 μ L nadopunjenom do 100 μ L fosfatnim puferom pH 6,8 u kiveti je dodano 2 mL Bradford reagensa.

Smjesa je ostavljena stajati na sobnoj temperaturi 5 minuta kako bi se razvila boja, nakon čega je intenzitet obojenja mjeren pri 595 nm uz slijepu probu koja je sadržavala 100 μ L fosfatnog pufera i 2 mL Bradford reagensa.

3.2.7. Određivanje pH optimuma

Utjecaj pH na aktivnost polifenol oksidaze proveden je u rasponu pH 5-9, uz L-3,4-dihidroksifenilalanin kao supstrat, s tim da je završna koncentracija L-3,4-dihidroksifenilalanina u reakcijskoj smjesi iznosila 10 mM.

Reakcijska smjesa se razlikovala obzirom na korišteni pufer. Za ispitivanje aktivnosti pri pH 5 i 6 korišten je 100 mM natrijev acetatni pufer, za ispitivanje aktivnosti pri 6, 7 i 8 korišten je 100 mM fosfatni pufer, a za ispitivanje aktivnosti pri 8 i 9 korišten je 100 mM Tris - HCl pufer.

3.2.8. Određivanje optimalne temperature

Utjecaj temperature na aktivnost polifenol oksidaze proveden je pri sljedećim temperaturama: 10°C, 24°C, 30°C, 40°C i 50°C.

Reakcijska smjesa za ispitivanje aktivnosti se sastojala od 450 μL 100 mM fosfatnog pufera pH 6,8, 50 μL enzima i 500 μL 20 mM L-3,4-dihidroksifenilalanina u 100 mM fosfatnom puferu pH 6,8. Prije testa aktivnosti, sve komponente reakcijske smjese, izuzev enzima su temperirane na željenu temperaturu.

3.2.9. Inhibicija polifenol oksidaze

Inhibicijski učinak različitih inhibitora na aktivnost polifenol oksidaze proveden je uz 10 mM L-3,4-dihidroksifenilalanin kao supstrat.

Volumen i sastav reakcijske smjese za ispitivanje enzimске aktivnosti bio je isti kao i za neinhibiranu reakciju, a jedina razlika bila je u volumenu dodanog 100 mM fosfatnog pufera pH 6,8 umanjenom za volumen dodanog inhibitora. Inhibicijski učinak ispitan je pri tri različite koncentracije inhibitora u reakcijskoj smjesi (10, 1 i 0,1 mM).

Ispitani su sljedeći inhibitori: natrijev klorid, natrijev tetraborat, limunska kiselina, askorbinska kiselina, EDTA, cistein, glutation.

Dodatno je ispitan denaturacijski učinak etanola i DMSO na aktivnost polifenol oksidaze dodatkom 10, 20 ili 50 μL etanola ili DMSO u reakcijsku smjesu. Na taj način njihov udio u smjesi iznosio je 1 %, 2 % ili 5 %.

4. REZULTATI I RASPRAVA

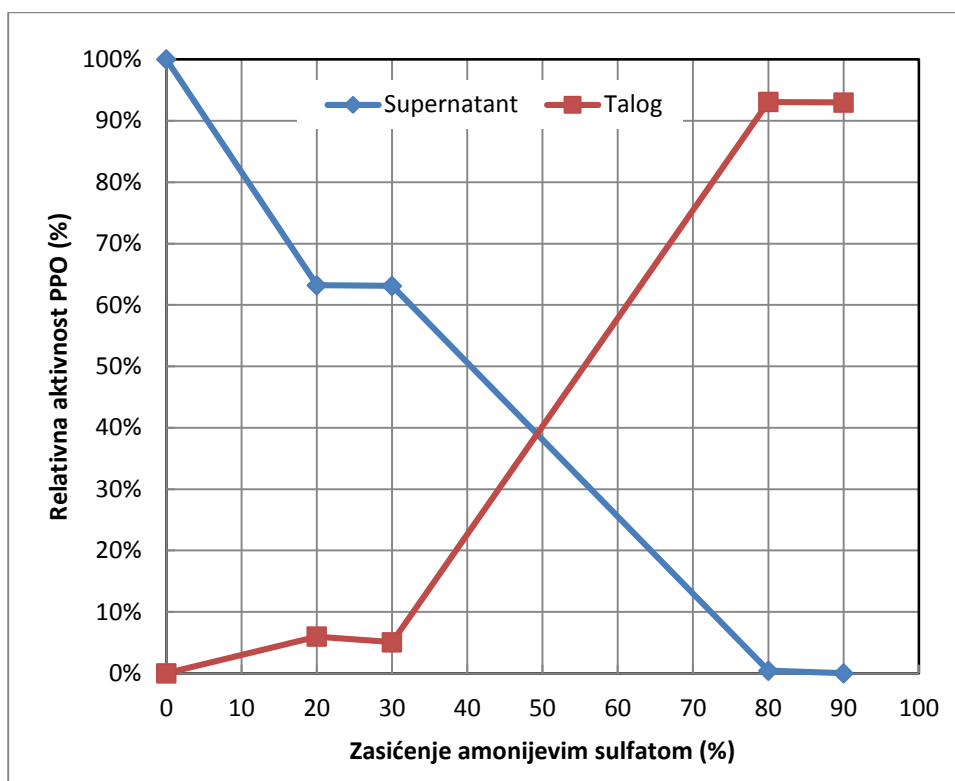
Cilj ovog istraživanja bio je izolirati i djelomično pročistiti enzim polifenol oksidazu (PPO) iz jabuke sorte Idared, te tako djelomično pročišćen enzim biokemijski okarakterizirati. U prvom koraku pročišćavanja enzim je izoliran iz jabuka homogenizacijom u pogodnom puferu pomoću laboratorijskog miksera sjeckalice, i potom je dobiveni sirovi ekstrakt podvrgnut taloženju pomoću amonijeva sulfata (AmS) različitih koncentracija kako bi se ustanovio optimalni raspon koncentracija amonijeva sulfata potrebitih za pročišćavanje. Po određivanju optimalnog raspona koncentracija amonijeva sulfata za pročišćavanje polifenol oksidaze, pristupilo se daljnjem postupku pročišćavanja koji je uključivao dodatno koncentriranje polifenol oksidaze primjenom taloženja acetonom, te prosušivanjem acetonskog taloga u struji dušika. Na takav način se dobio zadovoljavajuće pročišćen enzim koji je potom biokemijski okarakteriziran. Biokemijska karakterizacija uključila je određivanje optimalnog pH i optimalne temperature djelovanja enzima, supstratnu specifičnost pročišćenog enzima, inhibicijski učinak nekoliko različitih inhibitora, te utjecaj denaturanasa.

4.1. Optimalni raspon koncentracija amonijeva sulfata za taloženje polifenol oksidaze

Kako bi se ustanovio optimalni raspon koncentracija amonijeva sulfata potrebitog za pročišćavanje polifenol oksidaze iz pripremljenog ekstrakta provedena je serija taloženja amonijevim sulfatom (20, 30, 80 i 90%) gdje su u sirovi ekstrakt dodavane različite koncentracije amonijeva sulfata. Osnovni cilj ovoga postupka bio je pronaći raspon koncentracija amonijeva sulfata kod kojeg će se u prvom stupnju taloženja ukloniti značajna količina proteina uz zadržavanje polifenol oksidaze u supernatantu, a potom će se u sljedećem koraku taloženja iz supernatanta istaložiti polifenol oksidaza, i na takav način dobiti enzim povećane specifične aktivnosti. Ovisnost aktivnosti polifenol oksidaze prisutne u talozima i supernatantima nakon taloženja amonijeva sulfata pri različitim koncentracijama amonijeva sulfata prikazana je na **Slici 7**.

Rezultati pokazuju da taloženjem proteina pri 20 i 30% amonijeva sulfata ne dolazi do značajnog taloženja polifenol oksidaze, što se ogleda kao vrlo niska aktivnost polifenol oksidaze u talozima (**Slika 7**). Daljnje povišenje postotka zasićenja amonijevim sulfatom utječe na značajno povećanu aktivnost enzima u talozima, te je iz navedenog kao donja granica taloženja amonijevim sulfatom odabrano taloženje uz 30%-tno zasićenje amonijeva sulfata,

gdje je u talogu zabilježeno svega 5% ukupne aktivnosti polifenol oksidaze. Gubitak aktivnosti polifenol oksidaze u supernatantima pri ovim postotcima zasićenja amonijeva sulfata (30%) iznosi oko 35%. Najvjerojatniji razlog zabilježenom padu aktivnosti u supernatantima je potencijalni blagi denaturacijski efekt amonijeva sulfata na polifenol oksidazu, što se ogleda u sniženoj aktivnosti polifenoloksidaze u supernatantima tijekom određivanja aktivnosti enzima.

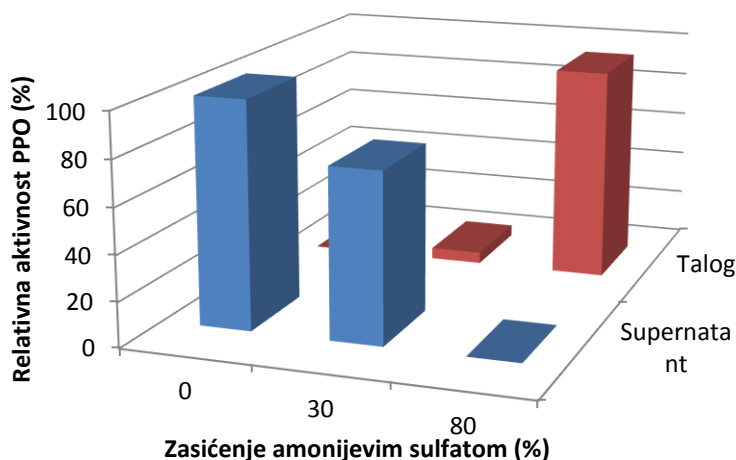


Slika 7 Utjecaj koncentracije amonijeva sulfata na relativnu aktivnost polifenol oksidaze u talozima i supernatantima

Povišenjem zasićenja amonijeva sulfata na 80 ili 90 % ustanovljeno je da supernatanti ne pokazuju aktivnost polifenol oksidaze, nego se sva aktivnost enzima nalazi u talozima. Štoviše, gotovo identična aktivnost polifenol oksidaze u talozima pri 80 i 90%-tnom zasićenju navodi da se kao gornja granica taloženja amonijevim sulfatom odabere 80%-tni amonijev sulfat.

Nakon što je postupak pročišćavanja polifenol oksidaze ponovljen pri odabranim rasponima amonijeva sulfata (30-80 %) (**Slika 8, Tablica 6**), potvrđeno je da optimalni raspon

koncentracija amonijeva sulfata za taloženje polifenol oksidaze iz jabuke sorte Idared iznosi 30-80%.



Slika 8 Aktivnost polifenol oksidaze u talozima i supernatantima uz primjenu optimalnog raspona koncentracija amonijeva sulfata za taloženje polifenol oksidaze

Ovi rezultati sukladni su optimalnim rasponima amonijeva sulfata predloženim u literaturi. Optimalni raspon koncentracija amonijeva sulfata primijenjen kod pročišćavanja polifenol oksidaze iz krumpira iznosio je od 30-80% (Yong i Hye, 1998.), a prilikom pročišćavanja polifenol oksidaze iz jabuke sorte Bramley 30-85% amonijev sulfat (Ni Eidhin i sur., 2006.). Slični rasponi amonijeva sulfata primijenjeni su prilikom pročišćavanja polifenol oksidaze iz dunje, 30-90% (Yağar i Sağıroğlu, 2002.), mente, 20-90% (Neves i sur., 2009.), te špinata, 35-65% (Golbeck i Cammarata, 1981.).

Primjenom navedenog raspona taloženja amonijevim sulfatom postignut je stupanj pročišćenja polifenol oksidaze od 3,45 (**Tablica 6**).

Sličan stupanj pročišćenja polifenol oksidaze primjenom dvostupanjskog taloženja pomoću amonijeva sulfata navodi nekolicina autora. Tako je stupanj pročišćenja polifenol oksidaze od 3,0 zabilježen u slučaju taloženja polifenol oksidaze pomoću amonijeva sulfata iz ekstrakta jabuka sorte Bramley (Ni Eidhin i sur., 2006.), a stupanj pročišćenja od 2,6 u slučaju pročišćenja polifenol oksidaze iz ekstrakta krumpira (Yong i Hye, 1998.).

Nešto viši stupanj pročišćenja uz dvostupanjsko taloženje amonijevim sulfatom pronađen je za ekstrakte polifenol oksidaze iz dunje, a iznosio je 5,85 (Yağar i Sağıroğlu, 2002.).

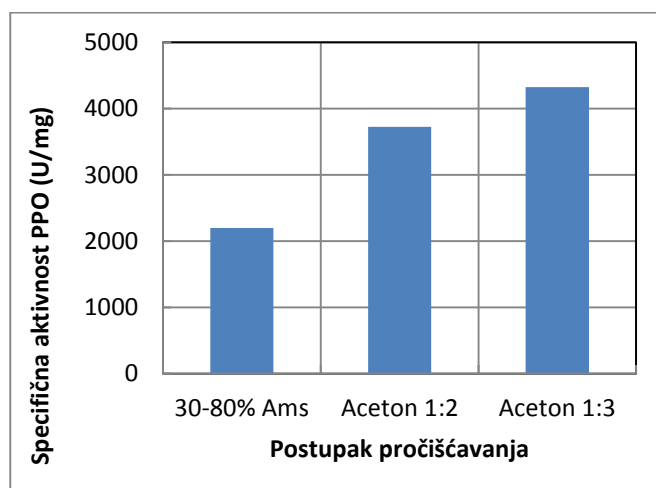
Obzirom da se radi o različitim izvorima za izolaciju polifenol oksidaze, moguće je da uočene razlike u stupnju pročišćenja potiču od biljne vrste, ili predstavljaju sortnu karakteristiku u slučaju različitih sorti jabuka.

4.2. Utjecaj taloženja acetonom i slijednog prosušivanja acetonskog taloga na aktivnost polifenol oksidaze

Kako je krajnji cilj ovog diplomskog rada bio dobiti dovoljno pročišćen enzim koji će se biokemijski okarakterizirati, a taloženje amonijevim sulfatom nije dovelo do zadovoljavajuće čistoće (faktor pročišćenja svega 3,45), provedeno je taloženje polifenol oksidaze acetonom u svrhu dodatnog pročišćenja.

Prema literaturnim podacima, polifenol oksidaza se može nakon taloženja amonijevim sulfatom dodatno obogatiti na specifičnoj aktivnosti (istaložiti) dodatkom acetona u volumnom omjeru 1:2 ili 1:3 (Adnin i sur., 1986.; Wong i sur., 1971.).

Stoga su provedena preliminarna ispitivanja utjecaja volumnog dodatka acetona na pročišćenost polifenol oksidaze iz jabuke sorte Idared i to u omjeru 1:2 i 1:3 (**Slika 9**). Rezultati su pokazali da se primjenom volumnog omjera 1:3 (supernatant:aceton) postiže bolje obogaćenje na specifičnoj aktivnosti polifenol oksidaze.

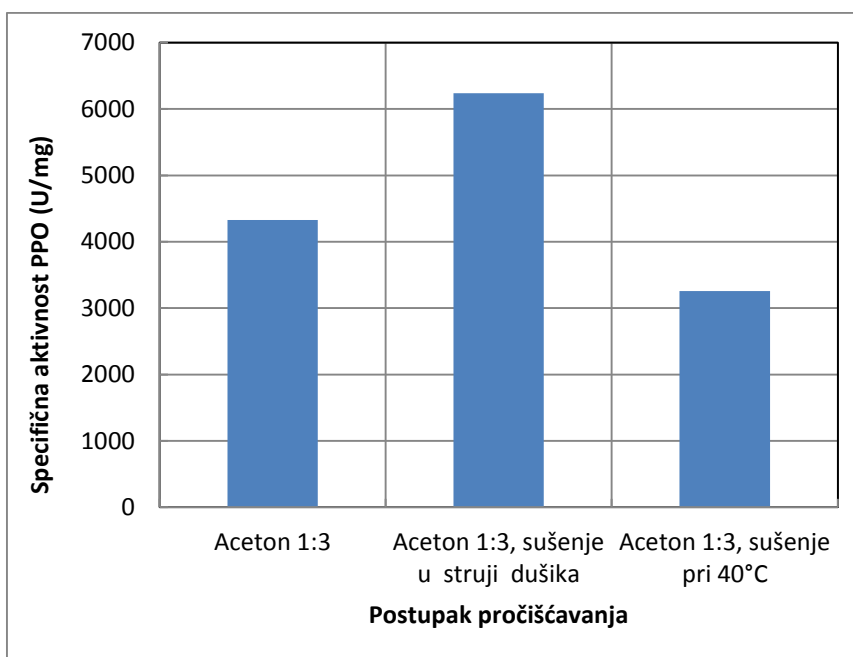


Slika 9 Utjecaj taloženja acetonom na obogaćenje specifične aktivnosti polifenol oksidaze

Otopljeni talozi nakon stupnjevito taloženja amonijevim sulfatom su taloženi ledeno hladnim (-20°C) acetonom u volumnom omjeru 1:2 i 1:3

Ovim postupkom pročišćenja dobivena je specifična aktivnost polifenol oksidaze od 4325 U/mg. Kako je ovako dobiven talog sadržavao značajnu količinu vezane vode, pristupilo se dodatnom koncentriranju enzimске aktivnosti na dva načina: a) acetonski talog enzima je sušen u struji dušika, i b) acetonski talog enzima je sušen u sušioniku pri 40°C.

Dodatnim prosušivanjem taloga aktivnost polifenol oksidaze se povećala na 6234 U/mg nakon sušenja u struji dušika, ali i smanjila na 3258 U/mg primjenom sušenja pri 40°C, i to najvjerojatnije zbog denaturacije enzima pod utjecajem povišene temperature (**Slika 10**).



Slika 10 Utjecaj prosušivanja acetonskog taloga na aktivnost polifenol oksidaze

Slijedom navedenih rezultata istraživanja odlučeno je da se nakon stupnjevito taloženja proteina amonijevim sulfatom (30-80%), daljnji postupak pročišćavanja polifenol oksidaze provede taloženjem acetonom u omjeru 1:3, i potom slijedno sušenjem acetonskog taloga u struji dušika.

Primjenom ovakovog načina pročišćavanja dobivena je pročišćena polifenol oksidaza specifične aktivnosti od 6234,45 U/mg, a ukupni stupanj pročišćenja iznosio je zadovoljavajućih 9,70, uz iskorištenje od 61,61% (**Tablica 6**).

4.3. Optimizirani postupak izolacije i djelomičnog pročišćavanja polifenol oksidaze

Po provedenoj optimizaciji uvjeta pročišćavanja polifenol oksidaze iz jabuka sorte Idared, proveden je *de novo* postupak pročišćavanja polifenol oksidaza koji je dao gotovo identične rezultate (**Tablica 6**). Postupak se sastojao od homogenizacije jabuka u pogodnom puferu, odvajanju supernatanta od taloga centrifugiranjem, dvostupanjskom taloženju polifenol oksidaza pomoću amonijeva sulfata (30-80%), taloženju pomoću acetona (v:v = 1:3), te prosušivanju taloga u struji dušika. Od početne specifične aktivnosti polifenol oksidaze koja je u sirovom ekstraktu iznosila 642,82 U/mg, polifenol oksidaza je primjenom odabranog postupka pročišćavanja pročišćena za faktor 9,7 te je aktivnost u prosušenom acetonskom talogu iznosila 6234,45 U/mg. Slična specifična aktivnost pročišćene polifenol oksidaze zabilježena je u slučaju izolacije polifenol oksidaze iz sorte jabuka Bramley (Ni Eidhin i sur., 2006.) gdje je iznosila 8977 U/mg. Međutim, u tom slučaju je aktivnost u sirovom ekstraktu iznosila 3009 U/mg, a nakon taloženja amonijeva sulfata (30-85%) i slijedne dijalize iznosila 8977 U/mg, što je dugoročno rezultiralo znatno nižim stupnjem pročišćenja od svega 3.

Tablica 6 Stupanj pročišćenja polifenol oksidaze iz jabuke

Korak pročišćavanja	Ukupna aktivnost (U)	Ukupni proteini (mg)	Specifična aktivnost (U/mg)	Iskorištenje(%)	Stupanj pročišćenja
Sirovi ekstrakt	67200,05	104,54	642,82	100,00	1,00
Taloženje amonijevim sulfatom (30-80%)	56006,77	25,26	2217,21	83,34	3,45
Taloženje acetonom uz prosušivanje taloga u struji dušika	41400,05	6,64	6234,45	61,61	9,70

Iz svega navedenog može se zaključiti da primjena postupka pročišćavanja predložena u ovom radu značajno doprinosi na obogaćenju specifične aktivnosti.

Nakon što je dobiven enzim (polifenol oksidaza) zadovoljavajućeg stupnja pročišćenja, pristupilo se njegovoj karakterizaciji koja je uključivala supstratnu specifičnost, optimalni pH i temperaturu, inhibicijski učinak određenih skupina inhibitora, te denaturacijski efekt DMSO i etanola.

4.4. KARAKTERIZACIJA POLIFENOL OKSIDAZE

4.4.1. Supstratna specifičnost

Aktivnost polifenol oksidaze je osim uz supstrat L-3,4-dihidroksifenilalanin, određivana i uz druge potencijalne supstrate pri tri različite koncentracije (10 mM, 2,5 mM i 0,1 mM). Ukupno je ispitano devet potencijalnih supstrata, a uz L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), to su bili: epikatehin, epigalokatehingalat, katehin, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina, 4-metilkatehol, tirozin i transferulinska kiselina.

U slučaju L-3,4-dihidroksifenilalanina kao supstrata, aktivnost polifenol oksidaze praćena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini 475 nm, a navedena valna duljina primijenjena je i pri mjerenju aktivnosti polifenol oksidaze uz kafensku kiselinu, 4-metilkatehol, tirozin i epikatehin. Mjerenje aktivnosti polifenol oksidaze u slučaju kada su supstrati bili klorogenska kiselina, katehin, epigalokatehingalat i transferulinska kiselina provedeno je pod istim uvjetima, s razlikom što je enzimska aktivnost praćena pri valnoj duljini 420 nm.

Polifenol oksidaza pokazala je sljedeću supstratnu specifičnost: katehin > epikatehin > 4-metilkatehol > klorogenska kiselina > L-3,4-dihidroksifenilalanin > kafeinska kiselina > epigalokatehingalat, dok u slučaju tirozina i transferulinske kiseline kao supstrata nije zabilježena enzimska aktivnost (**Tablica 7**).

Tablica 7 Supstratna specifičnost polifenol oksidaze iz jabuke sorte Idared

Supstrat	Koncentracija (mM)	Relativna aktivnost (%)*
L-3,4-dihidroksifenilalanin	10,0	100,0
	2,5	28,8
	0,1	12,3
Epikatehin	10,0	272,8
	2,5	211,5
	0,1	26,9
Epigalokatehingalat	10,0	8,6
	2,5	5,3
	0,1	0,5
Katehin	10,0	407,4
	2,5	251,0
	0,1	28,3
Kafeinska kiselina	10,0	62,5
	2,5	60,6
	0,1	11,9
Klorogenska kiselina	10,0	116,0
	2,5	81,1
	0,1	12,8
4-metilkatehol	10,0	255,8
	2,5	162,8
	0,1	9,3
Tirozin	10,0	0,0
	2,5	0,0
	0,1	0,0
Transferulinska kiselina	10,0	0,0
	2,5	0,0
	0,1	0,0

**Relativna aktivnost enzima (%) izračunata kao odnos aktivnosti uz ispitivani supstrat i aktivnosti uz 10 mM L-3,4-dihidroksifenilalanin.*

Polifenol oksidaza izolirana iz jabuka sorte Idared pokazala je afinitet za razgradnju različitih polifenolnih supstrata što je u skladu sa dostupnim literaturnim referencama (Ni Eidhin i sur., 2006; Jang i Moon, 2011; Zhou i sur., 1993; Rocha i Morais, 2001; Rocha i sur., 1998; Oktay i sur., 1995; Murata i sur., 1992; Murata i sur., 1995.). Međutim, redoslijed supstratne specifičnosti očito predstavlja sortnu karakteristiku. Naime, polifenol oksidaze izolirane iz

različitih sorti jabuka pokazuju svojstvenu supstratnu specifičnost (**Tablica 1**). Tako se u slučaju supstratne specifičnosti polifenol oksidaze izolirane iz sorte jabuka Bramley, te kore sorte jabuka Monroe kao najbolji supstrat polifenol oksidaze navodi 4-metilkatehol (Ni Eidhin i sur., 2006.; Zhou i sur., 1993.), u slučaju polifenol oksidaze izolirane iz jabuka sorte Jonagored najboljim supstratom se pokazao L-3,4-dihidroksifenilalanin (Rocha i Morais, 2001.) a u slučaju polifenol oksidaze izolirane iz jabuka sorte Amasya katehol (Oktay i sur., 1995.).

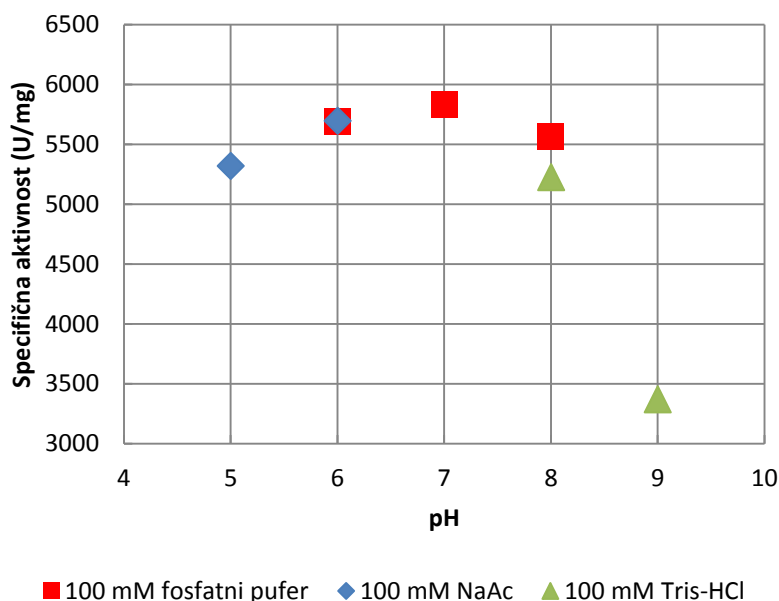
Polifenol oksidaza izolirana iz sorte jabuka Idared nije pokazala afinitet prema tirozinu i transferulinskoj kiselini. Da je tirozin slab supstrat za polifenol oksidazu iz jabuke pokazuju i druga istraživanja (Zhou i sur., 1993; Rocha i sur., 1998; Rocha i Morais, 2001; Ni Eidhin i sur., 2006.).

4.4.2. pH optimum

Optimalni pH polifenol oksidaze iz jabuka sorte Idared određivan je uz L-3,4-dihidroksifenilalanin kao supstrat u rasponu pH od 5 do 9. Pri tome se za određivanje aktivnosti polifenol oksidaze pri pH 5 i 6 koristio 100 mM natrijev acetatni pufer, pri pH 6, 7 i 8 100 mM natrijev fosfatni pufer, a pri pH 8 i 9 100 mM Tris-HCl pufer.

Rezultati su pokazali da polifenol oksidaza pokazuje maksimum aktivnosti pri pH 7 (**Slika 11**).

Relativno slične vrijednosti optimalnog pH za aktivnost polifenol oksidaze dobivene su i za druge sorte jabuka, ali uz katehol kao supstrat (**Tablica 3**). Tako polifenol oksidaza iz jabuka sorte Bramley pokazuje optimalni pH pri 6,5 (Ni Eidhin i sur., 2006.), dok u slučaju sorti jabuka Jonagored polifenol oksidaza pokazuje dva pH optima pri 5 i 7,5 (Rocha i Morais, 2001.). Za razliku od gore navedenih, optimalni pH za polifenol oksidazu iz jabuke sorte Amasya (Oktay i sur., 1995.) u potpunosti se slaže sa našim istraživanjem.

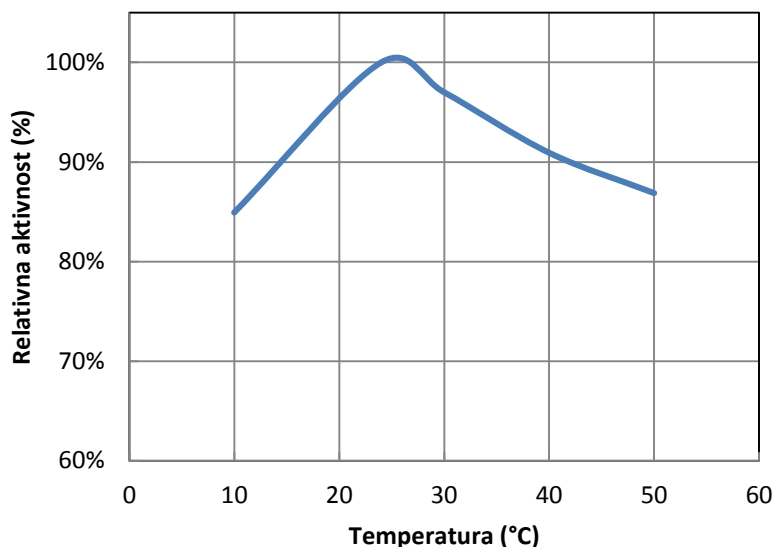


Slika 11 Utjecaj pH na aktivnost polifenol oksidaze iz jabuke

4.4.3. Optimalna temperatura

Određivanje optimalne temperature za aktivnost polifenol oksidaze iz jabuka sorte Idared provedeno je uz L-3,4-dihidroksifenilalanin kao supstrat pri optimalnom pH (7) uz 100 mM natrijev fosfatni pufer u temperaturnom rasponu od 10 do 50°C. Polifenol oksidaza je pokazala maksimalnu aktivnost pri 24°C, a u rasponu od 20 do 30°C pokazivala više od 95% od maksimalne aktivnosti (**Slika 12**).

Slične rezultate optimalne temperature za polifenol oksidaze izolirane iz različitih sorti jabuka navode i drugi autori, ali uz katehol kao supstrat. Tako se u slučaju polifenol oksidaze izolirane iz sorte jabuka Bramley (Ni Eidhin i sur., 2006.) i kore jabuke Monroe (Zhou i sur., 1993.) kao optimalna temperatura navodi 30°C, a u slučaju sorte jabuka Amasya (Oktay i sur., 1995.) temperatura od 18°C. Bitno je napomenuti da u ovom rasponu temperatura polifenol oksidaza iz jabuke sorte Idared pokazuje više od 95% maksimalne aktivnosti. Štoviše, određeni literaturni izvori upućuju da je optimalna temperatura ovisna i o upotrebljenom supstratu. Tako optimalna temperatura za aktivnost polifenol oksidaze izolirane iz mente, uz katehol kao supstrat, iznosi 30°C, a uz 4-metilkatehol, iznosi 15°C (Neves i sur., 2009.). Ovo upućuje da moguće razlike u optimalnoj temperaturi određenoj za polifenol oksidaze iz jabuka sorte Idared i drugih sorti jabuka dijelom proizilaze iz upotrebljenog supstrata.



Slika 12 Utjecaj temperature na aktivnost polifenol oksidaze iz jabuke

4.4.4. Inhibitori polifenol oksidaze

Određivanje inhibicijskog učinka askorbinske i limunske kiseline, cisteina, glutationa, natrijeva tetraborata, natrijeva klorida i etilendiamino tetraoctene kiseline na aktivnost polifenol oksidaze provedeno je uz L-3,4-dihidroksifenilalanin kao supstrat pri optimalnom pH (7) i optimalnoj temperaturi (24°C) i to primjenom tri različite koncentracije inhibitora (10 mM, 1 mM i 0,1 mM).

Najveći inhibicijski učinak na aktivnost polifenol oksidaze su pokazali glutation, askorbinska kiselina i cistein. Sva su tri inhibitora pri 10 mM koncentraciji u reakcijskoj smjesi izazvala 100%-tnu inhibiciju enzima. Glutation je pri 1 mM koncentraciji zadržao sposobnost maksimalne inhibicije, dok su askorbinska kiselina i cistein pri toj koncentraciji pokazali neznatno manju sposobnost inhibicije, odnosno inhibirali polifenol oksidazu 96% (askorbinska kiselina) ili 97% (cistein). I pri najnižoj koncentraciji (0,1 mM) glutation se pokazao vrlo dobrim inhibitorom izazivajući 94%-tnu inhibiciju, kao i askorbinska kiselina inhibirajući enzimsku reakciju 90%. Cistein je, za razliku od gore navedenih, pri 0,1 mM koncentraciji pokazivao neznatan postotak inhibicije od 2%.

Ostali ispitivani inhibitori nisu pokazali značajan inhibicijski učinak (< 20%), izuzev natrijeva tetraborata pri 10 mM koncentraciji u reakcijskoj smjesi kada je zabilježena 69% inhibicija.

Inhibicijski učinak gore navedenih inhibitora na aktivnost polifenol oksidaze prikazan je u **Tablici 8.**

Tablica 8 Utjecaj inhibitora na aktivnost polifenol oksidaze iz jabuke sorte Idared

Inhibitor	Koncentracija (mM)	Inhibicija (%)*
Askorbinska kiselina	10,0	100
	1,0	96
	0,1	90
Limunska kiselina	10,0	11
	1,0	6
	0,1	2
Cistein	10,0	100
	1,0	97
	0,1	2
Glutation	10,0	100
	1,0	100
	0,1	94
Natrijev tetraborat	10,0	69
	1,0	14
	0,1	10
Natrijev klorid	10,0	16
	1,0	10
	0,1	5
EDTA	10,0	17
	1,0	7
	0,1	6

** Inhibicija enzima (%) izračunata kao odnos aktivnosti uz ispitivani inhibitor i aktivnosti neinhibirane reakcije uz 10 mM L-3,4-dihidroksifenilalanin kao supstrat.*

Rezultati ovog istraživanja sukladni su literaturnim podacima. Askorbinska kiselina i cistein pokazali su se najjačim inhibitorima polifenol oksidaze izolirane iz sorte jabuka Bramley (Ni Eidhin i sur., 2006.) sa gotovo identičnim vrijednostima postotka inhibicije kao u našem radu. Cistein i askorbinska kiselina navode se kao najučinkovitiji inhibitori polifenol oksidaze izoliranih iz jabuka sorte Amasya (Oktay i sur., 1995.), kore jabuke sorte Monroe (Zhou i sur.,

1993.), jabuke sorte Jonagored (Rocha i Morais, 2001.), iz dunje (Yağar i Sağıroğlu, 2002.) i ananasa (Das i sur., 1997.).

Kako inhibicija enzima ne mora biti samo odraz primijenjenog inhibitora, nego može biti rezultat i primijenjenog otapala, pogotovo ukoliko se radi o inhibitoru koji nije topljiv u vodi, provedena je analiza inhibicijskog učinka dva organska otapala, etanola i dimetil-sulfoksida (DMSO) na aktivnost polifenol oksidaze. Inhibicijski učinak je određen uz L-3,4-dihidroksifenilalanin kao supstrat, pri optimalnom pH (7,0) i optimalnoj temperaturi (24°C) uz volumni udio denaturanasa u reakcijskoj smjesi od 5%, 2% i 1%.

I etanol i dimetil-sulfoksid su podjednako inhibirali aktivnost polifenol oksidaze (**Tablica 9**). Inhibicija enzima polifenol oksidaze iz jabuka sorte Idared iznosila je podjednako za oba denaturansa, tj. oko 40%, pri najvećim postocima volumnih udjela (5%). Za volumne udjele od 2%, kod oba denaturansa zabilježena je približno dvostruko manji postotak inhibicije (oko 22%), a za volumne udjele denaturanasa od 1% oko 12%.

Navedeni podaci upućuju da se kod ispitivanja utjecaja inhibicije polifenol oksidaze nepolarnim inhibitorima koje je potrebno otopiti u pogodnom organskom otapalu posebna pažnja mora posvetiti postotku prisutnog organskog otapala u reakcijskoj smjesi, budući samo organsko otapalo izaziva denaturaciju enzima što se onda očituje kao određeni postotak inhibicije.

Tablica 9 Utjecaj denaturanasa na aktivnost polifenol oksidaze iz jabuke

Denaturans	Volumni udio (%)	Inhibicija (%)*
Etanol	5,0	40
	2,0	21
	1,0	11
Dimetil-sulfoksid	5,0	39
	2,0	22
	1,0	14

** Inhibicija enzima (%) izračunata kao odnos aktivnosti uz ispitivani denaturans i aktivnosti neinhibirane reakcije uz 10 mM L-3,4-dihidroksifenilalanin kao supstrat.*

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobivenih ovim istraživanjem mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Optimizirani postupak izolacije i djelomičnog pročišćavanja polifenol oksidaze iz jabuke sorte Idared uključuje: primjenu dvostupanjskog taloženja pomoću amonijeva sulfata (30-80%), taloženje acetonom u omjeru 1:3, te slijedno sušenje acetonskog taloga u struji dušika.
2. Primjenom optimiziranog postupka pročišćavanja polifenol oksidaza specifične aktivnosti od 6234,45 U/mg pročišćena je 9,70 puta, uz iskorištenje od 61,61 %.
3. Optimalni pH za aktivnost polifenol oksidaze uz L-3,4-dihidroksifenilalanin kao supstrat je 7.
4. Optimalna temperatura polifenol oksidaze uz L-3,4-dihidroksifenilalanin kao supstrat, pri optimalnom pH 7 iznosi 24°C. U rasponu od 20-30°C polifenol oksidaza pokazuje više od 95 % od maksimalne aktivnosti.
5. Polifenol oksidaza pokazuje sljedeću supstratnu specifičnost: katehin > epikatehin > 4-metilkatehol > klorogenska kiselina > L-3,4-dihidroksifenilalanin > kafeinska kiselina > epigalokatehingalat.
6. Tirozin i transferulinska kiselina nisu supstrati polifenol oksidaze.
7. Polifenol oksidazu inhibiraju različiti inhibitori sljedećim učinkom: glutation \geq cistein \geq askorbinska kiselina > natrijev tetraborat > EDTA > natrijev klorid > limunska kiselina.
8. Najveći inhibicijski učinak na aktivnost polifenol oksidaze pokazuju glutation, askorbinska kiselina i cistein koji pri 10 mM koncentraciji u reakcijskoj smjesi izazivaju 100 %-tnu inhibiciju enzima.
9. Polifenol oksidaza je izuzetno osjetljiva na prisutnost polarnih organskih otapala poput etanola i dimetil-sulfoksida. Pri 5% volumnom udjelu etanola ili dimetil sulfoksida u reakcijskoj smjesi polifenol oksidaza gubi oko 40 % aktivnosti.

6. LITERATURA

- Adnin T, Adnan T, Augustin MA, Ghazali HM: Polyphenoloxidase from Starfruit (*Averrhoa carambola*, L.), *Pertanika* 9 (2): 219-224, 1986.
- Alyward F, Haisman DR: Oxidation system in fruits and vegetables – their relation to the quality of pressured products. *Advances in Food Research*, 17: 1-76, 1969.
- Anderson JV, Fuerst EP, Hurkman WJ, Vensel WH, Morris CF: Biochemical and genetic characterisation of wheat (*Triticum spp*) kernel polyphenol oxidases. *Journal of Cereal Science*, 44: 353–367, 2006.
- Bradford, MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248-254, 1976.
- Brooks DW, Dowson CR: Aspects of tyrosinase chemistry, in The Biochemistry of Copper. Peisach J, Aisen P, Blumberg WE, Eds., Academic Press, New York, 343-357, 1966.
- Cabanes J, Escribano J, Gandia-Herrero F, Garcia-Carmona F, Jimenez-Atienzar M: Partial purification of latent polyphenol oxidase from peach (*Prunus persica* L. Cv. Catherina), molecular properties and kinetic characterization of soluble and membrane-bound forms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55 (25): 10446-10451, 2007.
- Cash JN, Sistrunk WA, Stutte CA: Characteristics of Concord grape polyphenoloxidase involved in juice color loss. *Journal of Food Science*, 41 (6): 1398-1402, 1976.
- Chang TS: An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10 (6): 2440-2475, 2009.
- Crumière F: Inhibition of Enzymatic Browning in Food Products using Bio-Ingredients. Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University, Montreal, Quebec, 2000.
- Das JR, Bhat SG, Gowda LR: Purification and characterization of a polyphenol oxidase from Kew cultivar of Indian pineapple fruit. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 45 (6): 2031-2035, 1997.
- De Poix A, Rouet-Mayer MA, Philippon J: Action combinee des chlorures et de l'acide ascorbique sur l'inhibition des brunissements enzymatiques d'un broyat de pommes. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 14: 105-109. 1980.
- Doğru YZ, Mustafa EM: Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (*Petroselinum Crispum*, Apiaceae). *Food Research International*, 49 (1): 411-415, 2013.
- Erat M, Sakiroglu H, Kufrevioglu OI: Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula sp.*, *Food Chemistry*, 95 (3): 503-508, 2006.

- Fan Y, Flurkey WH: Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of Portabella mushrooms. *Phytochemistry*, 65 (6): 671-678, 2004.
- Fujita S, Saari NB, Maegawa M, Tetsuka T, Hayashi N, Tono T: Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (5): 1138-1142, 1995.
- Gacche RN, Shete AM, Dhole NA, Ghole VS: Reversible inhibition of polyphenol oxidase from apple using L-cysteine. *Indian Journal of Chemical Technology*, 13 (5): 459-463, 2006.
- Golbeck JH, Cammarata KV: Spinach Thylakoid Polyphenol Oxidase. *Plant Physiology*, 67 (5): 977-984, 1981.
- Gúray MZ: Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from thermophilic *Bacillus* sp.. *Magistarski rad*. Tehnološki institut u Izmiru, odjel za biotehnologiju i bioinženjering, 3-4, 2009.
- Horvat M: Sprječavanje posmeđivanja u svježim i osušenim jabukama sorte Jonagold. *Diplomski rad*. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2000.
- Ioannou I, Ghoul M: Prevention of enzymatic browning in fruit and vegetables. *European Scientific Journal*, 9 (30): 310-341, 2013.
- Jang JH, Moon KD: Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry*, 124 (2): 444-449, 2011.
- Janovitz-Klapp A, Richard F, Nicolas J: Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*, 28 (11): 2903-2907, 1989.
- Janovitz-Klapp AH, Richard FC, Goupy PM, Nicolas JJ: Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (4): 926-931, 1990
- Jukanti AK: Molecular and biochemical characterisation of wheat (*Triticum aestivum* L.) polyphenol oxidases (PPO-s). *Doktorski rad*. Montana State University, Bozeman, Montana., 2005.
- Kihara T, Murata M, Homma S, Kaneko S, Komae K: Purification and characterization of wheat (*Triticum aestivum*) polyphenol oxidase. *Food Science and Technology Research*, 11 (1): 87-94, 2005.
- Kim YJ, Uyama H: Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62 (15): 1707-1723, 2005.
- Kolodziejczyk K, Milala J, Sójka M, Kosmala M, Markowski J: Polyphenol oxidase activity in selected apple cultivars. *Journal of Fruit And Ornamental Plant Research*, 18 (2): 51-61, 2010.

- Kruger JE, Lineback D, Stauffer CE: Enzymes and their role in cereal technology. *American Association of Cereal Chemists*, St. Paul, Minnesota, 39 (9): 97-102, 245-249, 281-311, 325-328, 1987.
- Langdon TT: Preventing of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents. *Food Technology*, 41 (5): 64-67, 1987.
- Lee CY, Smith NL, Pennesi AP: Polyphenoloxidase from DeChaunac grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34 (9): 987-991, 1983.
- Lovas I: Sprječavanje enzimskog posmeđivanja u kriškama jabuke sorte „Idared“. *Diplomski rad*. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 1997.
- Macheix J, Fleuriet A, Billot J: Phenolic compounds in fruit processing. In *Fruit Phenolics*, (J. Macheix, A. Fleuriet and J. Billot, eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 239-312, 1990.
- Manohan D, Wai WC: Characterization of Polyphenol Oxidase in Sweet Potato (*Ipomoea Batatas* (L.)). *Journal for the Advancement of Science and Arts*, 3 (1): 14-31, 2012.
- Marques L, Fleuriet A, Macheix J: Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 33 (2): 193-200, 1995.
- Mathew AG, Parpia HAB: Food browning as a polyphenol reaction. *Advances in Food Research*, 19: 75, 1971.
- Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A, Yoshitsu H, Sugiyama M: Crystal structure of the met-form of the copper-bound streptomyces castaneoglobisporus tyrosinase complexed with a caddie protein. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (13): 8981-8990, 2006.
- Mayer AM, Harel E: Polyphenol oxidases in fruits – changes during ripening. In: *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*, ed Rhodes & Friend. Academic Press, New York, USA, pp 160-171, 1981.
- Mayer AM: Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67 (21): 2318–2331, 2006.
- McEvily AJ, Iyengar R, Otwell WS: Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32 (3): 253-273, 1992.
- Midhat J. Biljni pigmenti. <http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija-2/biljni-pigmenti> [24.9.2014.]
- Mihalyi K, Vamos-Vigyazo L, Kiss-Kutz N, Babos-Szebenyi E: The activities of polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables as to pH and temperature. *Acta Alimentaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 7: 57-61, 1978.
- Molnar-Perl I, Friedman M: Inhibition of browning by sulfur amino acids. 2. Fruit juices and protein-containing foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (8): 1648-1651, 1990.a

- Molnar-Perl I, Friedman M: Inhibition of browning by sulfur amino acids. 3. Apples and potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (8): 1652-1656, 1990.b
- Murata M, Kurokami C, Homma S: Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*). *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 56 (11): 1705–1710, 1992.
- Murata M, Tsurutani M, Tomita M, Homma S, Kaneko K: Relationship between apple ripening and browning: Changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (5): 1115-1121, 1995.
- Nakamura K, Amano Y, Kagami M: Purification and some properties of a polyphenol oxidase from Koshu grapes. *American Journal of Plant Physiology*, 34 (2): 122-127, 1983.
- Negishi O, Ozawa T: Inhibition of enzymatic browning and protection of sulfhydryl enzymes by thiol compounds. *Phytochemistry*, 54 (5): 481-487, 2000.
- Nematpour FS, Haghbeen K, Babei MK, Jazii FR, Nouraeen O, Yancheshmeh MB: The Banana Pulp Polyphenol Oxidase is a Tyrosinase. *Journal of Biological Sciences*, 8 (3): 526–533, 2008.
- Neves VA, Picchi DG, Aparecida da Silva M: Some Biochemical Properties of Polyphenoloxidase from Spearmint (*Mentha arvensis*). *Brazilian Archives of Biology and Tehnology*, 52 (4): 1001-1010, 2009.
- Ni Eidhin DM, Murphy E, O'Beirne D: Polyphenol Oxidase from Apple (*Malus domestica* Borkh. cv Bramley's Seedling): Purification Strategies and Characterization. *Journal Of Food Science*, 71 (1), 2006.
- Obradović V: Tehnologija konzerviranja i prerade voća i povrća - interna skripta. Požega, 2011.
- Octay M, Kúfrevioldılu I, Kocacalipkan I, Pakirođlu H: Polyphenoloxidase from Amasya apple. *Journal Of Food Science*, 60 (3): 494-496, 1995.
- Pichler D: Natrijev 2-merkaptotetan sulfonat kao potencijalni inhibitor enzimskog posmeđivanja. *Diplomski rad*. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2001.
- Pierpoint WS: The enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. *Biochemical Journal*, 98 (2): 567, 1966.
- Prikaz enzimskog posmeđivanja jabuke: <http://suite101.com/article/enzymes-simple-classroom-science-experiment-a188575> [13.2.13.]
- Rathjen AH, Robinson SP: The aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. *Plant Physiology*, 99 (4): 1619-1625, 1992.
- Rocha AMCN, Cano MP, Galeazzi MAM, Morais AMMB: Characterization of „Starking“ apple polyphenoloxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77 (4): 527–534, 1998.

- Rocha AMCN, Morais AMMB: Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from „Jonagored“ apple. *Food Controle*, 12 (2): 85–90, 2001.
- Santerre CR, Cash JN, Vannorman DJ: Ascorbic acid/ citric acid combinations in the processing of frozen apple slices. *Journal of Food Science*, 53 (6): 1713-1716, 1988.
- Sherman TD, Vaughn KC, Duke SO: A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 30 (8): 2499-2506, 1991.
- Siddiq M, Sinha NK, Cash JN: Characterization of polyphenoloxidase from Stanley plums. *Journal of Food Science*, 57 (5): 1177-1179, 1992.
- Šimunić N: Aktivnost polifenol oksidaze u ekstraktima brašna od cjelovitog zrna različitih sorti pšenice. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.
- Taylor SL, Higley NA, Bush RK: Sulphites in foods: Uses, analytical methods, residues, fate exposure assessment, metabolism, toxicity and hypersensitivity. *Advances in Food Research*, 30 (1): 1–76, 1986.
- Trejo-Gonzales A, Soto-Valdez H: Partial characterization of PPO extracted from „Anna“ apple. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 116 (4):672-675, 1991.
- Tsurutani M, Yanagida Y, Hagiwara S, Murata M, Homma S: Comparison of soluble and plastidal polyphenol oxidase in mature apples. *Food Science and Technology Research*, 8 (1): 42-44, 2002.
- Valero E, Varon R, Garcia-Carmona F: Characterization of polyphenol oxidase from Airen grapes. *Journal of Food Science*, 53 (5): 1482-1485, 1988.
- Vámos – Vigyázó L: Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15 (1): 49-127, 1981.
- Whitaker JR: Principles of Enzymology for the Food Sciences, Second Edition, Marcel Dekker, New York, 271-556, 1994.
- Wong TC, Luh BS, Whitaker JR: Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isozymes of Clingstone Peach. *Plant Physiology*, 48 (1): 19-23, 1971.
- Yağar H, Sağiroğlu A: Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince. *Turkish Journal of Chemistry*, 26 (1): 97–103, 2002.
- Yamasaki Y, Konno H, Noda K: Polyphenol oxidase from wheat bran is a serpin. *Acta Biochimica Polonica*, 55 (2): 325–328, 2008.
- Yong K CHO, Hye K AHN: Purification and Characterization of Polyphenoloxidase from potato: 1. purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*, 23 (6): 577-592, 1999.
- Yoruk R, Marshall MR: Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 27 (5): 361-422, 2003.

Zhou P, Smith NL, Lee CY: Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (4): 532–536, 1993.